

①⑨  Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

①⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 090 997
A2

①⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

①⑰ Anmeldenummer: 83102773.5

①⑮ Int. Cl.³: **A 61 L 15/04**
A 61 L 15/03

①⑱ Anmeldetag: 21.03.83

①⑳ Priorität: 02.04.82 DE 3212412

①㉓ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.10.83 Patentblatt 83/41①㉔ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE①㉕ Anmelder: Dr. Ruhland Nachf. GmbH
Stadtplatz 7
D-8425 Neustadt/Donau(DE)①㉖ Erfinder: Stemberger, Axel, Dr.-rer.nat.
Cramer-Klett-Strasse 35a
D-8014 Neubiberg(DE)①㉗ Vertreter: Hansen, Bernd, Dr.rer.nat. et al,
Hoffmann, Eitle & Partner Patentanwälte
Arabellastrasse 4
D-8000 München 81(DE)

①㉙ Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage.

①㉚ Gewebeverklebbare, flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen die schichtweise aufgebaut ist und eine 0,3 bis 2 cm dicke Kollagenschicht enthält, die wenigstens an einer Oberfläche eine 0,2 bis 2 mm dicke Fibrinogenschicht mit einer Fibrinogenmenge von 0,5 bis 10 mg/cm² aufweist und eine verbesserte Wundheilung ermöglicht.

EP 0 090 997 A2

Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage

Kollagen wird seit geraumer Zeit in der Chirurgie verwendet. Es kann in Form von Schwämmen oder Fasern zur Blutstillung verwendet werden und ist auch nach entsprechender Modifizierung zur Beschleunigung der Wundheilung geeignet. Bei Patienten mit defekter Blutgerinnung oder bei großflächigen Blutungen genügen übliche kollagene Wundauflagen nicht. Man hat daher bereits versucht, Kollagenmaterial mit dem Gewebe zu verkleben, wobei man Kleber auf Basis Resorcin-Formaldehyd, Kollagen oder Gelatine verwendete. Solche Kleber sind zwar hämostyptisch, jedoch wegen ihrer Toxizität für die Praxis ungeeignet. Dies gilt auch für Acrylatkleber und die Kombination mit kollagenen Wundauflagen.

15

Es ist bekannt, daß Kollagen kovalente Vernetzungen mit Bindegewebebestandteilen eingehen kann. Dabei finden Vernetzungen vom Kollagen über Schiff-Basen sowie Aldolkondensation statt. Bekannt ist auch, daß bei Basalmembranen die Gewebefestigkeit zusätzlich durch S-S Brücken des Basalmembrankollagens erreicht wird. Bekannt ist weiterhin, Proteine, wie Albumin mit intermolekularen S-S Bindungen nach milder

Réduktion und nachfolgender Oxidation über S-S
Brücken zu vernetzen.

- Bei Verletzungen bildet sich durch die Blutgerinnung
5 ein primärer Wundverschluß. Hierfür sind aggregierte
Thrombozyten und ein Fibrinnetzwerk verantwortlich.
Es ist bekannt, daß einzelne Fibrinmoleküle durch
Transglutaminasen (wie Faktor XIII) vernetzt werden.
Hierbei bilden sich neue Peptidbindungen zwischen Glut-
10 aminsäure und Lysin benachbarter Ketten. Mit der
Technik der Fibrinklebung, also durch Verwendung von
Fibrinogen und Thrombin, wird die Endphase der plas-
matischen Blutgerinnung nachgeahmt.
- 15 Die Fibrinklebung allein ist nicht in der Lage, groß-
flächige Blutungen zu stillen. Dies gelingt erst
durch eine kombinierte Anwendung der Fibrinklebung
mit einer resorbierbaren kollagenen Wundauflage.
Jedoch muß man dabei drei Komponenten bereithalten,
20 nämlich die kollagene Wundauflage, Thrombinlösung
mit Antifibrinolytika und eine tiefgefrorene hoch-
konzentrierte Fibrinogenlösung. Da Blutungen häufig
plötzlich und unprogrammiert auftreten, stehen diese
drei Komponenten im entscheidenden Augenblick
25 häufig nicht anwendungsbereit zur Verfügung, denn
zumindest die tiefgefrorene Fibrinogenlösung muß
zuvor aufgetaut werden. Auch das Mischen vor der
Applikation ist verhältnismäßig kompliziert.
- 30 In der "Wiener medizinische Wochenschrift Nr. 7 (1976)"
wird auf den Seiten 86 bis 89 über die lokale Anwen-
dung von Fibrinogen und Kollagen zur Blutstillung in
der Herzchirurgie berichtet. Bei der Technik der dort
beschriebenen Klebung verwendet man humanes Fibrinogen-
35 Kryopräzipitat, Thrombin, ein Faktor XIII Konzentrat

sowie ein Kollagenvlies. Das Fibrinogen wird auf die gewünschte Stelle aufgebracht und dort durch den Zusatz der Thrombinlösung und von Faktor XIII zur Gerinnung gebracht. Bei stärkeren Blutungen wendet
5 man das Kollagenvlies als vollständig resorbierbare Trägersubstanz an, wobei man auf das Kollagenvlies die Lösungen aufträgt und anschließend das Kollagen mit der mit Fibrinogen beschichteten Seite auf die blutende Stelle aufpreßt. Dadurch soll eine vollständige
10 Auspolymerisierung des Fibrins und Haftung der Fibrinfasern im Gewebe erfolgen. Bei dieser Klebetechnik erfolgt die Beschichtung des Kollagens mit Fibrinogen erst unmittelbar vor der Anwendung, um ein Kollabieren des Kollagenschwammes weitgehend zu vermeiden.

15 Aufgabe der Erfindung ist es, dem Chirurgen eine kollagene Wundauflage zur Verfügung zu stellen, die in vorbereiteter Form direkt während der Operation angewendet werden kann und wobei die vorerwähnten Nachteile der
20 Fibrinklebung in Kombination mit resorbierbarem Kollagen nicht auftreten. Verbunden mit dieser Aufgabe ist es, eine lagerfähige Kollagenzubereitung zur Verfügung zu stellen, die die für die Einleitung der lokalen Hämostase erforderlichen Komponenten enthält.

25 Diese Aufgabe wird durch eine gewebeverklebbare, kollagene Wundauflage gemäß dem Anspruch 1 gelöst.

Die erfindungsgemäße Wundauflage hat einen schichtweisen Aufbau. Die Hauptschicht besteht hierbei aus dem
30 Kollagen und zwar hat diese Schicht eine Dicke zwischen etwa 0,3 und 2 cm, vorzugsweise 0,7 bis 1 cm. Einseitig oder beidseitig auf dieser Kollagenschicht befindet sich eine Fibrinogenschicht. Diese Fibrinogenschicht hat eine
35 Dicke von etwa 0,2 bis 2 mm und wird auf die Kollagenoberfläche aufgebracht, wobei eine Verankerung der

Fibrinogenmoleküle mit den Kollagenmolekülen im Grenzgebiet der Schichten vorliegt.

Wesentlich ist, daß die Fibrinogenschicht, Fibrinogen
5 in einer Menge von 0,5 bis 10 mg, vorzugsweise 4 mg/cm² enthält.

Es ist häufig vorteilhaft, wenn das Fibrinogen das einseitig oder beidseitig auf das Kollagen als Schicht
10 aufgebracht wird, freie SH-Gruppen enthält. Diese freien SH-Gruppen können zuvor in dem Fibrinogen durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken ausgebildet sein, oder indem man Fibrinogen mit SH-Gruppen haltigen Fibrinogen abmischt. Weiterhin ist es auch möglich die in
15 Fibrinogen enthaltenen Disulfidbrücken unverändert zu lassen und zusätzlich SH-Gruppen einzubauen, z.B. nach der Methode von Benesch & Benesch in "Proceedings of the National Academy of the USA, Washington", Band 44, 1958, S. 848 bis 853 oder Biochem. Journ. 1966 101, Seiten
20 717 bis 720 (Stephen und Mitarbeiter).

Es kann vorteilhaft sein, wenn neben dem Fibrinogen wenigstens eine der Schichten noch Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseninhibitoren enthält,
25 wobei außerdem noch Thrombin vorhanden sein kann, mit dem proviso, daß das Thrombin sich nicht in der gleichen Schicht oder in unmittelbarem Kontakt mit Fibrinogen befindet.

30 Die Herstellung der erfindungsgemäßen kollagenen Wundauflage kann in folgender Weise erfolgen:

Zunächst wird Kollagen in an sich bekannter Weise präpariert. Das Kollagen soll dabei vorzugsweise einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Gewichtsverhältnis von Stickstoff zu Hydroxyprolin < 4 , insbesondere < 3 aufweisen.

$$\text{Faktor N/Hyp} = \frac{\text{mg N}}{\text{mg 4-Hyp}}$$

J. Mol.Bio.44 1969,Seite 161.

- 10 Eine 1,5 %-ige Kollagenlösung in 0,05 %-iger Essigsäure wird in bekannter Weise zu einem 0,5 cm dicken Kollagenschwamm gefriergetrocknet. Erwünschtenfalls kann man bei dieser Gefriertrocknung auch eine Lösung einsetzen, welcher man zuvor Antifibrinolytika
15 (Tranexamsäure) und/oder polyvalente Proteinaseninhibitoren (Aprotinin) zugegeben hat, wobei diese in solchen Mengen zugegeben werden, daß im fertigen Kollagenschwamm pro cm^2 eine Konzentration von 0,2 bis 10 mg bzw. 4-bis 1000 KIE vorliegt.

20

Getrennt von der Herstellung des Kollagenschwamms wird eine Fibrinogenlösung wie folgt hergestellt:

- 25 Fibrinogen für Infusionszwecke wird in isof. NaCl bis zu einer Konzentration von 30 mg Fibrinogen pro ml gelöst. Diese Lösung wird dann mit einer üblichen Sprühvorrichtung auf den zuvor hergestellten Kollagenschwamm unter sterilen Kautelen in einer Dicke von 0,2 bis 2 mm aufgesprüht, die eine Menge von 0,5
30 bis 10 mg/cm^2 ergibt, sofort gefriergetrocknet, wobei die dadurch ausgebildete Schichtdicke in der Regel 2 mm Schichthöhe nicht übersteigen darf, weil sonst die Haftung dieser Schicht schlecht ist. Mit dieser Technik wird eine ausreichende Verankerung in der Kollagen-
35 matrix sichergestellt. Gewünschtenfalls können auch

in die Fibrinogenschicht Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseninhibitoren eingearbeitet werden.

Es ist bekannt, Kollagen als Träger für Antibiotika, wie Gentamycin zu verwenden. Auch die erfindungsgemäßen Wundauflagen können Wirkstoffe enthalten, beispielsweise Gentamycin, Tetracyclin oder andere Antibiotika oder Chemotherapeutika.

10 Herstellung von Kollagen:

Von allen Pigmentschichten und Muskelresten befreite frische Rindersehnen wurden homogenisiert und eine Menge, die 100 g Trockengewicht entspricht, in 3 l 0,05 m Zitratpuffer (pH 3,7) 24 Stunden lang extrahiert und anschließend gegen 1 % Essigsäure 12 Stunden dialysiert. . .

Das in 3 l 1 % Essigsäure suspendierte Gewebe wird 48 Stunden bei 10°C unter ständigem Rühren mit Pepsin im Verhältnis Kollagen : Pepsin = 50 : 1 inkubiert.

Der Ansatz wird mit 1 % Essigsäure auf 5 l verdünnt und durch Zentrifugation von den ungelösten Sehnenfragmenten befreit.

Die viskose Kollagenlösung wird gegen alkalisiertes Leitungswasser (pH 8,0) dialysiert und dann scharf zentrifugiert. Der Rückstand wird erneut in 5 l 1 % Essigsäure gelöst und dialysiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der Faktor Stickstoff:4-Hydroxyprolin < 3 ist. Nach dem letzten Dialysieren wird mit 0,05 % Essigsäure eine 1,5 %-ige Kollagenlösung hergestellt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Zur Herstellung einer Antifibrinolytika- und/oder Proteinaseninhibitor-haltigen Kollagenschwammes von 10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung mit 0,2 g Tranexamsäure und/oder 40.000 KIE Aprotinin
5 versetzt und gefriergetrocknet.

Zur Herstellung eines Kollagen-Gentamycin-Schwammes von 10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung auf pH 1 bis 2 eingestellt, mit 100 mg Gentamycinsulfat
10 versetzt und gefriergetrocknet.

Herstellung von Fibrinogenlösung:

Im Handel befindliches steriles Fibrinogen wird in
15 steriler isotoner Na HCl gelöst, so daß eine Lösung von 30 mg Fibrinogen/ml Lösung vorliegt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Um ein SH-Gruppen-modifiziertes Fibrinogen zu erhalten,
20 arbeitet man wie folgt:

Fibrinogen wird in isotoner Kochsalzlösung bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. 10 ml dieser Fibrinogenlösung werden mit 1 ml einer N-Acetylhomocystein-
25 thiolaktolösung (60 mg/ml Aqua dest) und 10 ml eines Carbonatpuffers (pH 10,6) versetzt und bei 0°C 35 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 40 ml eines Phosphatpuffers pH 7,0 i 0,4 gestoppt. Anschließend
30 wird mit der Technik der Membranfiltration unter Verwendung eines Filters (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 5.000) die Lösung entsalzt und gleichzeitig eingeeengt.

Herstellung von Wundauflagen, die Kollagen und Fibrinogen enthalten:

Es wird zunächst 100 ml einer 1 %-igen Kollagen-
5 lösung in eine Metallform von 10 x 10 cm gegeben, nach üblicher Technik gefriergetrocknet und der resultierende Schwamm dann sterilisiert. Unter aseptischen Bedingungen wird nun dieser sterilisierte Kollagenschwamm mit einer Fibrinogenlösung besprüht,
10 wobei pro Quadratzentimeter Kollagenoberfläche 5 mg Fibrinogen aufgetragen werden. Anschließend erfolgt eine erneute Gefriertrocknung und Verpackung unter sterilen Kautelen. Die Kollagenschicht hat eine Dicke von 10 mm
15 und die darauf befindliche Fibrinogenschicht eine Dicke von ca. 0,3 mm.

Resultate der in vitro und in vivo Versuche mit Kollagen-Fibrinogen-sowie Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen-
20 Schwämmen.

In vitro:

Die so hergestellten Wundauflagen wurden mit einer
25 Reißfestigkeitsmaschine getestet, bestehend aus einem Kraftaufnehmer, verbunden mit einem Schreiber. Die Eichung erfolgte im Bereich von 100 bis 1000 Pond. Die Kollagen-Fibrinogenschwämme wurden mit der Kollagenseite auf eine Plastikscheibe (D=1 cm) mittels eines technischen Klebers geklebt. Die fibrinogenbeschichtete
30 Seite wurde dann mit 0,1 ml Thrombinlösung (1000 NIH/ml) befeuchtet und nach 20 Minuten in der Testmaschine die Reißfestigkeit bestimmt. Es resultierten Werte von 730 Pond/cm² (Mittelwert aus 7 Messungen).

In vivo:

In einer Studie an 400 Ratten wurden die (Gentamycin)
Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen (als Fibrocoll be-
5 zeichnet) zur Anastomosensicherung am Colon mit der
herkömmlichen Gewebeklebung mit Plasmafraktionen (Fi-
brinklebesystem = FK) untersucht.

10 a) Kontrollgruppe (Enterotomien mit 7 invertierenden
Einzelknopfnähten nach Lember.

b) zusätzliche Applikation von FK

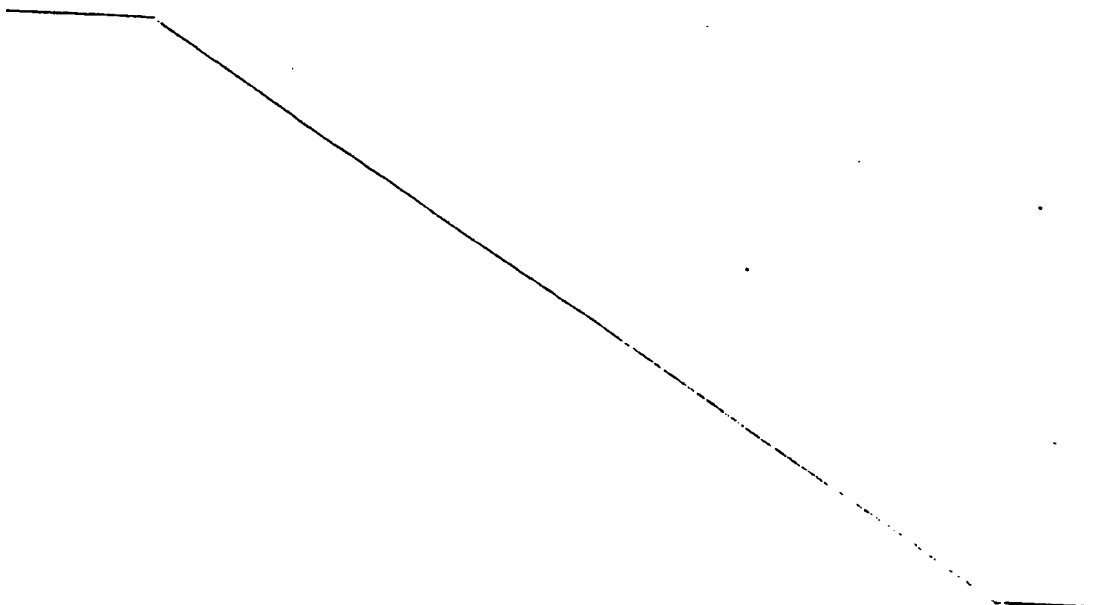
15 c) FK mit Kollagenvlies (fibrinogen-, gentamycin-frei)

d) Nahtsicherung mit Fibrocoll

e) Fibrocoll mit Gentamycin (1 mg/cm²)

20 In der Initialphase der Wundheilung zeigten die mit ver-
schiedenen Klebesystemen behandelten Tiere bis zum
3. postoperativen Tage im Nahtbereich eine deutlich

25



höhere Wundfestigkeit. Gegenüber der herkömmlichen Fibrinklebetechnik waren bei Verwendung von Fibrocoll Adhäsionen im Wundbereich vermindert. Durch die Applikation der Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen Wundauflagen wurde eine kontrollierte Freigabe des Antibiotikums beobachtet, die Serumkonzentrationen lagen weit unter der toxischen Grenze.

10 In einer weiteren Versuchsserie wurden Hemihepatektomien in "finger fracture technigne" bei 5 Schweinen durchgeführt und nach Ligatur der faßbaren Arterien und Venen die blutenden Parenchymdefekte mit Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen versorgt. Im folgenden postoperativem Verlauf wurden Nachblutungen nie beobachtet, die
15 Resorption der Materialien war nach 12 Wochen abgeschlossen.

Mit den (Gentamycin) Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen steht ein Material zur Verfügung das bei einfacher, rascher, sicherer Handhabung ausgezeichnet zur Blutstillung eingesetzt werden kann. Weiter wird eine Verbesserung der Wundheilung bei gleichzeitigem Antibiotikaschutz beobachtet.

25

Patentansprüche:

1. Trockene, vlies- oder schwammförmige, gewebeverklebbare, flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen, dadurch gekennzeichnet, daß sie schichtweise durch
5 Gefriertrocknung einer Kollagen/Fibrinogen-Kombination aufgebaut ist und eine 0,3 bis 2 cm dicke Kollagenschicht enthält, die wenigstens an einer Oberfläche eine 0,2 bis 2 mm dicke Fibrinogenschicht mit einer Fibrinogenmenge von 0,5
10 bis 10 mg/cm² aufweist und in dem Kollagen verankert ist.
2. Wundauflage gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen
15 SH-Gruppen enthält.
3. Wundauflage gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen SH-Gruppen enthält, die entweder durch nachträgliche Sulfhydrierung in das Fibrinogenmolekül eingebracht
20 oder durch Reduktion der Disulfidbrücken im Fibrinogenmolekül gebildet wurden.
4. Wundauflage gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie
25 zusätzlich einen Arzneimittelwirkstoff enthält.
5. Wundauflage gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie
30 in wenigstens einer der Schichten Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren und/oder Thrombin enthält, wobei jedoch die Kombination Thrombin-Fibrinogen in einer Schicht ausgeschlossen
35 ist.

6. Wundaufilage gemäß Anspruch 4, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß der Arzneimittel-
wirkstoff ein Antibiotikum ist.
- 5 7. Wundaufilage gemäß Anspruch 6, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß das Antibiotikum
Gentamycin ist.
- 10 8. Wundaufilage gemäß Anspruch 1, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß das Kollagen
einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Ge-
wichtsverhältnis von Stickstoff zu 4-Hydroxyprolin
von <4 , vorzugsweise <3 hat.

15

20

25

30

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)